

## Mikroskop zur Auf- und Durchlichtmikroskopie

Die Erfindung bezieht sich auf ein Mikroskop, bei dem eine  
5 Probe zwischen zwei Objektiven angeordnet ist und dabei sowohl im Auflicht als auch im Durchlicht beobachtet werden kann.

Ein wichtiges Anliegen bei Weiterentwicklungen in der Mi-  
10 kroskopie besteht gegenwärtig darin, Verfahren und Anordnungen zu schaffen bzw. zu vervollkommen, die es ermöglichen, Objekte bei Zweifachdurchstrahlung sowohl im Auf- als auch im Durchlicht zu beobachten, was sowohl der Erhöhung des Auflösungsvermögens als auch der Kontraststeigerung  
15 dienlich ist.

Diesbezüglich sind bereits Anordnungen bekannt, bei denen vom Objekt transmittiertes Auflicht mit einer Rückspiegleinrichtung nochmals auf die Rückseite des Objektes zurückgeworfen wird. In dieses Sachgebiet ist auch die nach-  
20 folgend beschriebene Erfindung einzuordnen.

Eine frühe Lösung mit einer Rückspiegleinrichtung für das vom Objekt transmittierte Licht beschreibt die DE 10 83  
25 065. Hier ist im Strahlengang hinter dem Objekt ein Vielfach-Tripelspiegel vorgesehen, der das polarisierte Licht einer Auflichtbeleuchtung depolarisiert und mit einem im Beobachtungsstrahlengang angeordneten gekreuzten Analysator  
30 derart zusammenwirkt, daß nur der vom Tripelspiegel ausgehende depolarisierte Strahlungsanteil den Analysator passieren kann und sich so ein Durchlichtbild des im Auflicht beleuchteten Objektes ergibt.

## Patentansprüche

- 5 1. Mikroskop, bei dem eine lichtdurchlässige Probe zwischen zwei Objektiven (2,3;20,21) mit zumindest etwa gleichen optischen Kenndaten positioniert und mindestens einem der Objektive (3,21) ein Spiegel (5,23) nachgeordnet ist, der das durch die Probe (1,19) transmittierte Licht in sich selbst zurückwirft.
- 10 2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beide Objektive (2,3;20,21) dieselbe Numerische Apertur (NA) und auch dieselben übrigen Kenndaten aufweisen, wobei beide Objektive (2,3;20,21) bevorzugt als Plan-
- 15 aprochromaten mit  $NA \geq 1,4$  ausgebildet sind.
- 20 3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, mit Auflichtbeleuchtung und Feldübertragung der Bildinformation, dadurch gekennzeichnet, daß eines der beiden Objektive (2,3) als Mikroskopobjektiv (2) dient und das zweite Objektiv (3) Teil einer Rückspiegeleinrichtung (4) ist, durch welche die Probe (1) seiten- und höhenrichtig auf sich selbst abgebildet wird.
- 25 4. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Blenden, Wollastonprismen, Polarisatoren und/oder weitere Baugruppen zur optischen Kontrastierung in den Strahlengang eingeordnet sind.

5. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, jedoch mit kohärenter Beleuchtungsquelle, bei dem einer der Spiegel (5) als phasenkonjugierender Spiegel ausgeführt ist.

5

6. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Mikroskopstrahlengang (9) ein dichroitischer Strahlteiler (8) zur Einspiegelung der Beleuchtungsquelle (6) vorgesehen ist.

10

7. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Mikroskopobjektiv (2) und Okular (11) ein weiterer Spiegel (12) vorgesehen ist, auf den die Probe (1) durch das Mikroskopobjektiv (2) abgebildet wird, wobei dieser Spiegel (12) für die Beleuchtungsstrahlung durchlässig, jedoch für einen von der Probe (1) kommenden ausgewählten Strahlungsanteil, bevorzugt für Fluoreszenzstrahlung, undurchlässig ist.

20

8. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, ausgebildet als Laser-Scanning-Mikroskop, dadurch gekennzeichnet, daß eines der beiden Objektive (20,21) als Mikroskopobjektiv (20) dient und das zweite Objektiv (21) Teil einer Rückspiegeleinrichtung (22) ist, die einen phasenkonjugierenden Spiegel oder einen adaptiven Spiegel (23) aufweist, durch den die Wellenfront des reflektierten Lichtes mit der Wellenfront des transmittierten Lichtes zur Deckung gebracht wird.

30

9. Mikroskop nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß  
- der adaptive Spiegel (23) mit einer auf eine Membran  
aufgebrachten, formveränderlichen Spiegelfläche aus-  
stattet ist und die Membran auf ihrer der Spiegelfläche  
abgewandten Seite mehrere einzelne Elektroden gegen-  
überstehen, an die Membran einerseits und die Elektro-  
den andererseits elektrische Potentiale gelegt sind und  
die Verformung der Membran durch Veränderung der Poten-  
tiale bzw. der zwischen Membran und Elektroden wirksa-  
men elektrostatischen Kräfte hervorgerufen wird oder  
- die Membran auf ihrer der Spiegelfläche abgewandten  
Seite mit mehreren einzelnen piezoelektrischen Antrie-  
ben verbunden ist und die Verformung der Membran durch  
unterschiedliche Ansteuerung der piezoelektrischen An-  
triebe hervorgerufen wird.

10. Mikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Elektroden und/oder die piezoelektrischen Antriebe  
mit einer Detektionseinrichtung für einen aus dem Beob-  
achtungsstrahlengang ausgekoppelten Strahlungsanteil,  
bevorzugt einer von der Probe ausgehenden Fluoreszenz-  
strahlung, in Verbindung stehen.

11. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, da-  
durch gekennzeichnet, daß die Rückspiegeleinrichtung  
(22) als Hellfeldanordnung ausgebildet ist, wobei sie  
zwei Objektive aufweist, die gemeinsam ein optisches  
System mit einer Ausgangsschnittweite von unendlich  
bilden.

12. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Rückspiegeleinrichtung (22) aus dem Mikroskopstrahlengang ausschwenkbar und an ihrer Stelle ein Photomultiplier (13) zur Durchlichtdetektion einschwenkbar ist.
13. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der Objektive (2,3;20,21) mit Verstelleinrichtungen zur Verschiebung in axialer und/oder radialer Richtung verbunden ist und die Verstellung in Abhängigkeit von der Bewertung des Beobachtungsstrahlenganges nach Intensität und/oder Kontrast vorgesehen ist.
14. Mikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verstelleinrichtungen mit Antriebselementen, bevorzugt mit piezomechanischen Antriebselementen, gekoppelt sind.
15. Mikroskop nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Detektor (17) für einen aus dem Beobachtungsstrahlengang ausgekoppelten Strahlungsanteil, bevorzugt einer von der Probe (19) ausgehenden Fluoreszenzstrahlung, vorhanden ist.

## Bezugszeichenliste

	1	Probe
5	2	Mikroskopobjektiv
	3	Objektiv
	4	Rückspiegeleinrichtung
	5	Spiegel
	6	Beleuchtung
10	7	Anregungsfilter
	8	dichroitischer Strahlteiler
	9	Mikroskopstrahlengang
	10	Sperrfilter
	11	Okular
15	12	teildurchlässiger Spiegel
	13	Photomultiplier
	14	Laser
	15	Lochblende
	16	Meßblende
20	17	Detektor
	18	Strahlteiler
	19	Probe
	20	Mikroskopobjektiv
	21	Objektiv
25	22	Rückspiegeleinrichtung
	23	Spiegel
	24	Ansteuerschaltung

### Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Mikroskop, bei dem eine  
5 Probe zwischen zwei Objektiven angeordnet ist und dabei sowohl im Auflicht als auch im Durchlicht beobachtet werden kann.

Bei einem Mikroskop mit Feldübertragung weisen zwei Objektive (2,3) weitestgehend gleiche optische Kenndaten auf und  
10 mindestens einem der beiden Objektive (2,3) ist ein Spiegel (5) nachgeordnet, der das durch die Probe transmittierte Licht exakt in sich selbst zurückwirft. Auf diese Weise kommt es zu einer Zweifachdurchstrahlung des Präparates bei  
15 optimaler Ausleuchtung des Raumwinkels.

Bei einem Laser-Scanning-Mikroskop sind ebenfalls zwei Objektive mit gleichen optischen Kenndaten vorgesehen und  
mindestens einem der Objektive ist ein phasenkonjugierender  
20 oder ein adaptiver Spiegel nachgeordnet.

Fig.1

Allerdings entsteht hier aufgrund des Einflusses von Bildfehlern (Aberationen usw.) und von Justierungenauigkeiten ein verhältnismäßig lichtschwaches und kontrastarmes Bild  
5 des zu beobachtenden Objektes.

In einer hierauf bezogenen Weiterentwicklung nach DE 32 04 686 A1 ist ein optisches System für Durchlichtmikroskopie bei Auflichtbeleuchtung dargestellt, bei dem mit einer spe-  
10 ziell ausgebildeten Rückspiegeleinrichtung angestrebt wird, Lichtstrahlen, die durch das Objekt hindurchtreten und dann wieder auf das Objekt reflektiert werden, in beiden Richtungen auch tatsächlich gleiche Objektpunkte passieren zu lassen. Dazu wird vorgeschlagen, als Rückspiegeleinrichtung  
15 beispielsweise ein Autokollimationssystem mit einer Optik zu verwenden, welche die Rückseite des Objektes auf einen ebenen Spiegel abbildet und das entstehende Bild auf die Objektunterseite zurück abbildet. Mit diesem System bzw. der daraus entwickelten Anordnung wird eine verbesserte  
20 Kontrastverstärkung erreicht. Das Autokollimationssystem besteht zur Vermeidung von Aperturverlusten beispielhaft aus zwei Objektiven mit unendlicher Ausgangsschnittweite, in deren Brennpunkt jeweils die Objektebene bzw. die Oberfläche des ebenen Spiegels liegt.

25

Allerdings sind auch bei der auf diese Weise vorgenommenen Rückspiegelung noch Justierungenauigkeiten und Bildfehler festzustellen, die dazu führen, daß das Licht nach dem zweiten Objektiv nicht exakt parallel ist bzw. das zu beob-  
30 achtende Objekt nicht präzise seiten- und höhenrichtig auf sich selbst abgebildet wird.



Ausgehend davon liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, die Effizienz bei der Rückspiegelung zu erhöhen bzw. sicherzustellen, daß das transmittierte Auflicht von der Rückspiegeleinrichtung mit höherer Genauigkeit wieder in sich selbst zurückgeworfen wird.

Erfindungsgemäß wird das erreicht mit einem Mikroskop, bei dem eine Probe zwischen zwei Objektiven positioniert ist, die weitestgehend gleiche optische Kenndaten haben und mindestens einem der beiden Objektive ein Spiegel nachgeordnet ist, der das durch die Probe transmittierte Licht exakt in sich selbst zurückwirft, so daß es bei der Zweifachdurchstrahlung des Präparates zu einer optimalen Ausleuchtung kommt. Das so vom gesamten Probenvolumen gewonnene Bild kann im Beobachtungsstrahlengang eines Mikroskops mit feldübertragender Funktionsweise beobachtet werden, wobei eines der beiden Objektive als Mikroskopobjektiv dient und das zweite Objektiv Teil einer Rückspiegeleinrichtung ist.

Dabei ist die Reflektorfläche des Spiegels, der dem Rückspiegelobjektiv nachgeordnet ist, nicht plan ausgeführt, wie das im Stand der Technik der Fall ist, sondern sie weist eine in erster Näherung an die Wellenfront des Rückspiegelobjektivs angepaßte sphärische Krümmung auf. Bevorzugt ist die Reflektorfläche asphärisch gekrümmt und so der Ausgangswellenfront des Rückspiegelobjektivs angepaßt.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungen der Erfindung ist vorgesehen, daß die beiden Objektive dieselbe numerische Apertur (NA) haben und auch bezüglich der übrigen

Kenndaten soweit möglich übereinstimmen, wobei beide Objektive bevorzugt als Planapochromaten mit  $NA \geq 1,4$  ausgebildet sind.

- 5 Es ist möglich und liegt auch im Rahmen dieser Erfindung, in den Strahlengang in bekannter Weise Blenden, Wollastonprismen, Polarisatoren bzw. Analysatoren und/oder weitere Baugruppen zur optischen Kontrastierung einzuordnen. Es lassen sich alle optischen Kontrastierverfahren anwenden, mit denen unter Verzicht auf einen schädigenden Eingriff in das Präparat eine künstliche Kontrastierung erzielt werden kann, wie Dunkelfeldmethode, Phasenkontrastverfahren mit Umwandlung von Phasenverschiebungen in Helligkeitswerte, Polarisationskontrastverfahren zur Beobachtung doppelbrechender Proben, Erzeugung eines differenziellen Interferenzkontrastes (DIC) und vor allem auch Fluoreszenzkontrastierung.

- Denkbar ist auch eine Ausgestaltung der Erfindung, bei der eine kohärente Beleuchtungsquelle vorhanden und der in der Rückspiegeleinrichtung vorgesehene Spiegel als phasenkonjugierender Spiegel ausgebildet ist. Mit der Phasenkonjugation werden statistische Störungen in Echtzeit optimiert, indem an der phasenkonjugierenden Spiegelfläche eine elektromagnetische Welle erzeugt wird, die sich nicht nur wie gewünscht in entgegengesetzter Richtung ausbreitet, sondern darüber hinaus auch eine umgekehrte Phasenverteilung bzw. ein entgegengesetztes Vorzeichen der Phase hat.

- 30 So wird im Gegensatz zum herkömmlichen Spiegel die Verzerrung der Wellenfront korrigiert, was dazu führt, daß das

Licht durch das zweite Objektiv wieder exakt in den Fokus des Mikroskopobjektivs abgebildet wird. Damit werden die Verluste, die durch Abbildungsfehler und Justageungenauigkeiten im Stand der Technik noch auftreten, wesentlich besser kompensiert.

Nichtlineare Erscheinungen lassen sich bei Verwendung einer Laserquelle zur Beleuchtung im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Aufbau sehr gut ausnutzen, da aufgrund der Bündelung des Laserlichts beim zweifachen Durchgang durch die Probe die Wahrscheinlichkeit der Mehrphotonenabsorption wesentlich erhöht wird. Wird das Laserlicht über einen dichroitischen Strahlteiler in den Mikroskopstrahlengang eingekoppelt, kann die verdoppelte Wellenlänge, die von der Probe reemittiert wird, in einfacher Weise beobachtet werden.

Im Rahmen der Erfindung liegt es auch, einen weiteren Spiegel vorzusehen und diesen zwischen Mikroskopobjektiv und Okular so zu positionieren, daß die Probe durch das Mikroskopobjektiv auf diesen Spiegel abgebildet wird. Diese Ausgestaltungsvariante ist insbesondere im Zusammenhang mit der Fluoreszenzmikroskopie von Interesse, wobei dieser Spiegel für die Beleuchtungsstrahlung durchlässig, jedoch für einen von der Probe kommenden ausgewählten Strahlungsanteil, wie etwa die Fluoreszenzstrahlung, undurchlässig ist.

Mit einer solchen Anordnung wird vorteilhaft erreicht, daß die beiden sich in Bezug auf die Probe symmetrisch gegenüberstehenden Objektive bei homogener Immersion einen optischen Resonator bilden, mit dem sich geringste Phasenstö-

rungen, die durch die Probe in diesen Resonator eingebracht werden, nachweisen lassen und insofern mit hoher Auflösung Auskunft über die Probe geben.

- 5 Die letztgenannte Ausgestaltung ist vor allem deshalb in der Fluoreszenzmikroskopie vorteilhaft anwendbar, da das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht im Vergleich zum Erregerlicht eine sehr geringe Intensität besitzt. Auf die vorgeschlagene Weise gelingt es, das Fluoreszenzlicht, das  
10 nicht vom Mikroskopobjektiv direkt erfaßt wird, mit Hilfe des zweiten Objektivs in der Rückspiegeleinrichtung zu erfassen und wieder in den Fokus des Mikroskopobjektivs zurückzuspiegeln. Dort wird es gesammelt und zusätzlich der Detektion zugrunde gelegt.

- 15 Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf ein Laser-Scanning-Mikroskop, bei dem ebenfalls eine lichtdurchlässige Probe zwischen zwei Objektiven mit zumindest etwa gleichen optischen Kenndaten positioniert und mindestens einem  
20 der Objektive ein Spiegel nachgeordnet ist, wobei dieser Spiegel als phasenkonjugierender oder adaptiver Spiegel ausgebildet ist, durch den die Wellenfront des reflektierten Lichtes mit der Wellenfront des transmittierten Lichtes zur Deckung gebracht bzw. das Licht in Bezug auf Richtung  
25 und Phasenfront exakt in sich zurückgeworfen wird.

- Damit werden die Vorteile der erfindungsgemäßen Anordnung insbesondere auch für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nutzbar. In diesem Zusammenhang hat sich das  
30 optische Scanning bewährt, bei dem ein von Schwingspiegeln oder rotierenden Polygonprismenspiegeln abgelenkter Lichtpunkt das Objekt überstreicht. Im Beleuchtungs- und Beob-

achtungsstrahlengang konjugiert angeordnete Lochblenden sorgen dafür, daß nur das Licht aus der jeweils eingestellten Fokusebene den Detektor erreicht. In bekannter Weise lassen sich damit sowohl orts- als auch zeitaufgelöste Daten gewinnen, dank des erfindungsgemäßen Aufbaus der Anordnung allerdings mit wesentlich höherer Effizienz als im bisher bekannten Stand der Technik.

Die Spiegelfläche des phasenkonjugierenden Spiegels ist, wie bereits angedeutet, so ausgebildet, daß die Wellenfront einer ebenen Welle nach Reflexion an der Spiegelfläche so verändert wird, daß Verzerrungen korrigiert und das reflektierte Licht exakt in sich zurückgeworfen wird.

Dagegen ist der alternativ einzusetzende adaptive Spiegel mit einer auf eine Membran aufgetragenen formveränderlichen Spiegelfläche versehen, wobei der Membran auf ihrer der Spiegelfläche abgewandten Seite mehrere einzelne Elektroden gegenüberstehen und an die Membran einerseits und die Elektroden andererseits elektrische Potentiale gelegt sind; die gewünschte Verformung der Membran wird durch Veränderung der Potentiale und somit der zwischen Membran und Elektroden wirksamen elektrostatischen Kräfte ausgelöst.

Dabei wird die Ansteuerung in Abhängigkeit von der jeweils erreichten Bildqualität vorgenommen und durch entsprechende Verformung der Spiegelfläche veranlaßt, daß das vom Spiegel reflektierte Licht exakt in sich zurückgeworfen wird bzw. Bildfehler und Justierungenauigkeiten ausgeglichen werden.

30

Der adaptive Spiegel kann auch so ausgestaltet sein, daß die Membran auf ihrer der Spiegelfläche abgewandten Seite

mit mehreren einzelnen piezoelektrischen Antrieben verbunden ist und die Verformung der Membran durch unterschiedliche Ansteuerung der piezoelektrischen Antriebe hervorgerufen wird.

5

Die Elektroden und/oder die piezoelektrischen Antriebe, mit denen die verformbaren Spiegelflächen gekoppelt sind, können über eine Auswerteeinheit für einen aus den Beobachtungsstrahlengang ausgekoppelten Strahlungsanteil mit einer  
10 Detektionseinrichtung in Verbindung stehen. Der Strahlungsanteil wird beispielsweise nach Intensität bewertet, dabei ein Intensitätssignal gewonnen und dieses der Ermittlung eines Stellsignals für Verformung der Spiegelmembran zugrundegelegt.

15

Besonders bevorzugt ist diese Weiterführung des Erfindungsgedankens im Zusammenhang mit der Fluoreszenzmikroskopie anwendbar, indem die Intensität der von der Probe ausgehenden Fluoreszenzstrahlung bewertet wird.

20

In weiteren Ausgestaltungsvarianten der Erfindung, die sowohl feldübertragende als auch Scanning-Systeme betreffen, kann vorgesehen sein, daß die Rückspiegeleinrichtung als Hellfeldanordnung ausgebildet ist, die zwei Objektive auf-  
25 weist, die gemeinsam ein optisches System mit einer Ausgangsschnittweite von Unendlich bilden.

30

Des weiteren ist es insbesondere im Hinblick auf Anwendungen zur Mikro-Photometrie vorteilhaft, wenn die Rückspiegeleinrichtung aus dem Mikroskopstrahlengang ausschwenkbar und an ihrer Stelle ein Photomultiplier zur Durchlichtde-

tektion einschwenkbar ist. So wird erreicht, daß beim Übergang zu photometrischen Messungen keine aufwendigen Umbauten und Justierungen erforderlich sind.

- 5 Eine weitere Ausgestaltung sowohl des feldübertragenden als auch des Laser-Scanning-Mikroskops besteht darin, daß mindestens eines der Objektive mit einer Verstelleinrichtung zur Verschiebung in axialer und/oder radialer Richtung verbunden ist und die Verstellung in Abhängigkeit von der erzielten Bildqualität bzw. der Intensität und/oder des Kontrastes vorgenommen wird. Diese Einstellmöglichkeit ist insbesondere für die Justierung des bereits oben erwähnten optischen Resonators vom Vorteil. Hier haben sich als Stellantriebe vor allem piezomechanische Antriebselemente  
10 bewährt.  
15

- Diese Möglichkeit der axialen und/oder radialen Verstellung dient jedoch nicht nur schlechthin der Justierung des optischen Resonators, sondern eröffnet darüber hinaus Wege zu  
20 quasi neuen Kontrastierverfahren, insbesondere wenn Justiergenauigkeiten im Submikrometerbereich, bevorzugt im Bereich von einigen 100nm, verwirklicht werden. Solche Genauigkeiten sind mit Piezo-Stellelementen ohne weiteres erreichbar, und es lassen sich auf diese Weise die in der  
25 klassischen Optik bekannten Phasen- und Differenzialinterferenz-Kontrastverfahren hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit weiterentwickeln.

- Die Erfindung soll nachfolgend anhand zweier Ausführungsbeispiele näher erläutert werden. In den zugehörigen Zeichnungen zeigt:  
30



Fig.1 die erfindungsgemäße Anordnung bei einem feldübertragenden Mikroskop

Fig.2 die erfindungsgemäße Anordnung bei einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

5

In Fig.1 ist eine Probe 1 zwischen dem Mikroskopobjektiv 2 und einem zum Mikroskopobjektiv 2 hinsichtlich seiner optischen Kenndaten gleichwertigen weiteren Objektiv 3, das Teil einer Rückspiegeleinrichtung 4 ist, aufgenommen. Es  
10 ergeben sich optimale Auflösungen, wenn für beide Objektive 2,3 beispielsweise Planaprochromaten mit einer numerischen Apertur von  $\geq 1,4$  verwendet werden.

Von Vorteil ist es weiterhin, wenn das Präparat zwischen  
15 zwei gleich- und hochwertigen Deckgläsern aufgenommen ist, die einen völlig symmetrischen Strahlengang gewährleisten.

In der Rückspiegeleinrichtung 4 ist dem Objektiv 3 ein Spiegel 5 nachgeordnet, der das durch die Probe 1 transmittierte Licht exakt in sich selbst zurückwirft. Dabei ist  
20 die reflektierende Oberfläche des Spiegels 5 nicht plan ausgeführt, sondern sie weist eine in erster Näherung an die Wellenfront des Objektivs 3 angepaßte Sphäre auf. Besonders bevorzugt ist die Spiegeloberfläche asphärisch gekrümmt bzw. der Ausgangswellenfront des Objektivs 3 angepaßt.  
25

Insbesondere bei der Fluoreszenzmikroskopie, auf die sich das dargestellte Beispiel beziehen soll, wird das Beleuchtungslicht von einer Lichtquelle 6 ausgehend durch einen  
30 Anregungsfilter 7 in den Mikroskopstrahlengang 8 eingespie-



gelt und trifft so auf die Probe 1. Das nun von der Probe 1 ausgehende Fluoreszenzlicht strahlt im gesamten Raumwinkel ab, wird also sowohl vom Mikroskopobjektiv 2 als auch vom Objektiv 3 erfaßt. Nach dem Durchgang durch das Objektiv 3 ist das Fluoreszenzlicht parallel und trifft auf den Spiegel 5, von dem es präzise in den Fokus des Mikroskopobjektivs 2 zurückgespiegelt und vom Mikroskopobjektiv 2 gesammelt wird; von da steht es nach Durchgang durch den dichroitischen Strahlteiler 8, den Sperrfilter 10 und das Okular 11 zur Beobachtung (oder anderweitiger Auswertung) zur Verfügung.

Sofern als Beleuchtungsquelle 6 ein Laser vorgesehen ist und die Beobachtung der Probe 1 in kohärentem Licht erfolgt, kann als Spiegel 5 vorteilhaft ein phasenkonjugierender Spiegel vorgesehen sein, mit dessen Verwendung sichergestellt ist, daß das auf die Spiegelfläche treffende Licht wie beabsichtigt hochgenau in sich zurückgeworfen wird.

Damit kann die Mikroskopie sowohl mit Durchlicht- als auch mit Auflichtanregung betrieben werden. Der Anregungsfilter 7 sorgt dafür, daß von der Beleuchtungsquelle 6 nur die Anregungsstrahlung in den Mikroskopstrahlengang 9 gelangt. Dagegen läßt der Sperrfilter 10 nur das von der Probe emittierte, auszuwertende Fluoreszenzlicht passieren.

Der dichroitische Strahlteiler 8 reflektiert das von der Beleuchtungsquelle 6 kommende kurzwellige Erregerlicht und läßt das von der Probe 1 ausgehende längerwellige Fluoreszenzlicht ungehindert passieren. Somit wird das Erregerlicht auf die Probe 1 gerichtet, während die von dem Mikro-

skopobjektiv 2 und dem Objektiv 3 aufgesammelte Fluoreszenzstrahlung durch den Strahlteiler 8 und den Sperrfilter 10 hindurch zum Okular 11 bzw. in das Auge des Beobachters gelangt.

5

Wie in Fig.1 angedeutet, kann im Mikroskopstrahlengang 9 zwischen dem Mikroskopobjektiv 2 und dem Strahlteiler 8 ein teildurchlässiger Spiegel 12 vorgesehen sein. Ist dieser Spiegel 12 so ausgebildet, daß er für die Beleuchtungswellenlänge durchlässig ist, die Fluoreszenzwellenlänge jedoch  
10 wieder auf die Probe zurückwirft, so bilden das Mikroskopobjektiv 2 und das Objektiv 3 den bereits erwähnten optischen Resonator, mit dem sich geringste Phasenstörungen nachweisen lassen.

15

In Fig.1 ist weiterhin angedeutet, daß die Rückspiegeleinrichtung 4 gegen einen Photomultiplier 13 austauschbar ist. Das kann mit einer Schwenkeinrichtung erreicht werden, womit die Anordnung ohne aufwendigen Umbau auch für photometrische Durchlicht-Messungen konfiguriert werden kann.  
20

In Fig.2 ist das Prinzip eines Laser-Scanning-Mikroskops mit einem Laser 14, einer im Laserstrahlengang angeordneten Lochblende 15, einer zur Lochblende 15 konjugiert angeordneten Meßblende 16, einem Detektor 17 und einem Strahlteiler 18 dargestellt.  
25

Die mit dem Laserlicht bestrahlte Lochblende 15 wird in die Probe 19 abgebildet, wobei diese mit der Intensitätsverteilung eines Airy-Scheibchens beleuchtet wird. Dabei wird auf  
30 einen Punkt der Probe 19 gezielt, von dem ein Bild auf der Meßblende 16 entsteht, das mit dem Detektor 17 nach Lage

und Größe ausgewertet werden kann. Die Meßblende 16 läßt dabei nur Licht aus einer eingestellten Fokusebene passieren.

- 5 Analog zum erstgenannten Ausführungsbeispiel (nach Fig.1) befindet sich auch hier die Probe 19 zwischen zwei Objektiven, wovon eines das Mikroskopobjektiv 20 bildet und ein weiteres Objektiv 21 Teil einer Rückspiegeleinrichtung 22 ist. Innerhalb dieser Rückspiegeleinrichtung 22 ist dem Objektiv 21 ein Spiegel 23 nachgeordnet, der als phasenkonjugierender oder adaptiver Spiegel ausgebildet sein kann. Mit einem solchen Spiegel wird auch hier (wie bereits anhand des feldübertragenden Systems dargestellt) erreicht, daß das von der Probe 19 transmittierte Laserlicht in Bezug auf  
10 Richtung und Phasenfront exakt in sich zurückgeworfen wird.  
15

- Für den besonderen Fall, daß der Spiegel 23 als adaptiver Spiegel ausgebildet und mit Stellelementen zur Verformung seiner Spiegelfläche ausgestattet ist, kann, wie in Fig.2  
20 angedeutet, eine Ansteuerschaltung 24 vorgesehen sein, die eingangsseitig mit dem Detektor 17 und ausgangssseitig mit den Stellelementen des adaptiven Spiegels 23 verbunden ist.

- Wird beispielsweise die Ansteuerschaltung 24 so programmiert, daß sie in Abhängigkeit von der vom Detektor 17 empfangenen Strahlungsintensität Stellsignale an den adaptiven Spiegel 23 ausgibt, so wird hiermit vorteilhaft erreicht, daß bei entsprechender Betätigung der Stellelemente die Krümmung der Spiegelfläche sich selbsttätig so einstellt,  
25 daß der Detektor 17 eine von der Probe 19 ausgehende Fluoreszenzstrahlung mit maximaler Intensität empfangen kann.  
30

5

10

1. The first group of people who are interested in the results of the study are the researchers themselves. They want to know how well the study was conducted and whether the results are reliable and valid. They also want to know how the study can be used to inform future research and practice.